

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号
特開2003-294735
(P2003-294735A)

(43)公開日 平成15年10月15日(2003. 10. 15)

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコ-ト*(参考)
G 0 1 N 33/53		G 0 1 N 33/53	D 4 H 0 4 5
33/569		33/569	F
// C 0 7 K 14/51	Z N A	C 0 7 K 14/51	Z N A
16/24		16/24	

審査請求 未請求 請求項の数8 O L (全 9 頁)

(21)出願番号 特願2002-98315(P2002-98315)

(22)出願日 平成14年4月1日(2002. 4. 1)

特許法第30条第1項適用申請有り 平成13年12月11日～
13日 日本免疫学会開催の「第31回日本免疫学会総会」
において文書をもって発表

(71)出願人 399032282

株式会社 免疫生物研究所
群馬県藤岡市中字東田1091-1

(72)発明者 高口 善信

沖縄県中頭郡西原町字上原170-201

(72)発明者 川上 和義

沖縄県那覇市首里石嶺町2-96-1 医学
部職員宿舎3-102

(74)代理人 100086324

弁理士 小野 信夫

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 結核診断剤およびこれを含有する結核診断用キット

(57)【要約】

【課題】 本発明は新規な結核診断マーカーであるオステオボンチンを効率よく測定するための結核診断剤およびこれを含有する結核診断用キットを提供すること。

【解決手段】 オステオボンチンまたはそのフラグメントペプチド部分に対する抗体を含有することを特徴とする結核診断剤およびこれを含有する結核診断用キット。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 オステオポンチンまたはそのフラグメントペプチド部分に対する抗体を含有することを特徴とする結核診断剤。

【請求項2】 オステオポンチンのフラグメントペプチド部分が、次の(a)または(b)で表されるペプチドを含むものである請求項第1項記載の結核診断剤。

(a) IPVKQADSGSSEEEKQ

(b) KSKKFRRPDIQYPDATDE

【請求項3】 結核の重篤度を判定するものである請求項第1項または第2項記載の結核診断剤。

【請求項4】 オステオポンチンの特定のエピトープを認識するオステオポンチンまたはそのフラグメントペプチド部分に対する第一の抗体を含む第一の試薬と、第一の抗体の認識するオステオポンチンのエピトープとは別のエピトープを認識するオステオポンチンまたはそのフラグメントペプチド部分に対する第二の抗体を含む第二の試薬とを含有することを特徴とする結核診断用キット。

【請求項5】 第一の試薬が固相化された第一の抗体を含む試薬であり、第二の試薬が標識された第二の抗体を含む試薬である請求項第4項記載の結核診断用キット。

【請求項6】 第一の抗体が、下記式(a)、

(a) IPVKQADSGSSEEEKQ

で表されるペプチドを含むオステオポンチンのフラグメントペプチド部分に対する抗体であり、第二の抗体が、下記式(b)、

(b) KSKKFRRPDIQYPDATDE

で表されるペプチドを含むオステオポンチンのフラグメントペプチド部分に対する抗体である請求項第4項または第5項記載の結核診断用キット。

【請求項7】 結核の重篤度を判定するものである請求項第4項ないし第6項の何れかの項記載の結核診断用キット。

【請求項8】 結核の重篤度を、血漿または血清中のオステオポンチン量を指標として判定することを特徴とする請求項第7項記載の結核診断用キット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は結核の診断に使用することのできる結核診断剤およびこれを含有する結核診断用キットに関する。

【0002】

【従来の技術】結核は、結核菌により引き起こされる疾病であり、全世界で毎年200万人を超える死亡者数が報告されている。近年、結核は抗結核薬の発達や医療技術の進歩により治らない病気ではなくなってきた。その一方でHIV/AIDSをはじめとする免疫低下宿主の増加や多剤耐性結核菌の出現という新たな問題も生じてきている。

【0003】従来、結核の診断は喀痰等の結核菌を含む検体の培養を行い、培養した検体に存在する結核菌の数等を指標にして行われていた。しかしながら、この診断では結核菌の培養に数週間を費やすため、診断結果が得られるまでに時間がかかるものであった。また、現在ではポリメラーゼ連鎖反応(PCR)等の遺伝子技術を用いる新たな結核の診断技術も開発されているが、この診断に係る費用が高いことおよび診断結果の信頼性が低い等の問題が指摘されてきた。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】従って、結果が出るまでの時間が短く、簡便あり、かつ信頼度の高い結核の診断技術の提供が待ち望まれており、本発明はこのような技術の提供をその課題とするものである。

【0005】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、先に、オステオポンチンアイソフォームに対する抗体を見出し、更にこれを利用することでオステオポンチン量の測定が簡便に行えることを見出し、別途特許出願をした(特願2000-107578)。

【0006】本発明者らは、上記オステオポンチンアイソフォームに対する抗体の利用範囲を拡大すべく、種々の疾患の患者について血漿中のオステオポンチン量と疾患の関係を調べていたところ、結核患者、特に重症患者においては血漿中のオステオポンチン値が健康人と比べて有意に高いことを見出した。そして、上記オステオポンチンに対する抗体を含有する試薬は、結核診断剤および結核診断用キットとして利用しうることを見出し、本発明を完成した。

【0007】すなわち、本発明はオステオポンチンまたはそのフラグメントペプチド部分に対する抗体を含有することを特徴とする結核診断剤を提供するものである。

【0008】また、本発明はオステオポンチンの特定のエピトープを認識するオステオポンチンまたはそのフラグメントペプチド部分に対する第一の抗体を含む第一の試薬と、第一の抗体の認識するオステオポンチンのエピトープとは別のエピトープを認識するオステオポンチンまたはそのフラグメントペプチド部分に対する第二の抗体を含む第二の試薬とを含有することを特徴とする結核診断用キットを提供するものである。

【0009】

【発明の実施の形態】本発明の結核診断剤および結核診断用キットで用いられる抗体は、オステオポンチン(Osteopontin)またはそのフラグメント部分に対する抗体である。この抗体の抗原であるオステオポンチンは、骨、様々の臓器あるいは血液、尿、乳汁、胆汁から見いだされる、アミノ酸314(ヒト)残基からなる分子量50K~80Kの糖蛋白質である。この糖蛋白質は、分子のほぼ中央に細胞接着配列であるアルギニン・グリシン・アスパラギン酸(RGD)配列を有し、フ

ィプロネクチン、コラーゲン、ヒトロネクチン等と同様に細胞外基質として分類されている。

【0010】最近、オステオポンチンと、ヒト全身性エリテマデス（SLE）等の自己免疫疾患や関節リウマチとの関係が注目されている。また、オステオポンチンは炎症細胞（特にマクロファージ）や血管平滑筋細胞（SMC）に走化的に働くこと、更には傷害血管局所に浸潤したマクロファージが産生するオステオポンチンが、誘導型NO合成酵素（iNOS）の発現を制御して一酸化窒素（NO）による血管の緊張性の調節に関与することも報告されている。

【0011】しかしながら、オステオポンチンと結核との関連については全く知られておらず、また、例えば血漿中のオステオポンチン量を測定することにより結核の診断ができることも全く知られていなかった。

【0012】本発明の結核診断剤に用いられる抗体は、上記オステオポンチンまたはそのフラグメントペプチド部分（以下、「オステオポンチン類」という）を抗原とし、常法に従って処理をすることによって得ることができるものであって、オステオポンチンを特異的に認識する抗体であれば特に限定されず使用することができる。

【0013】オステオポンチン類に対する抗体の作成において、抗原となるオステオポンチンは、初乳由来の精製タンパク質として株式会社免疫生物研究所（製品番号50040）より入手することができる。このオステオポンチン精製タンパク質を用いて常法により、ウサギ、マウス等に皮下注射あるいは皮内注射することにより抗体を作製することができる。

【0014】また、オステオポンチンのフラグメントペプチド部分とは、オステオポンチンをトロンビン、マトリックスメタロプロテイナーゼ等のタンパク質分解酵素等、好ましくはトロンビンにより分解して得られるフラグメントペプチドまたはオステオポンチンのアミノ酸配列（PubMed Accession No. BAA03554）より、3～100の長さ、好ましくは5～40の長さのペプチドを常法により合成して得られるペプチドである（以下、これらを「フラグメントペプチド類」という）。

【0015】上記のフラグメントペプチド類を用いて抗体を作成するには、例えば、トロンビンにより切断されたフラグメントペプチド等のフラグメントペプチド類をそのまま抗原として用いることもできるが、好ましくは、オステオポンチン分子内に存在する複数の細胞接着ドメインを含むフラグメントペプチド類を生体高分子化合物と結合させた結合物を抗原として用いて調製することが好ましい。

【0016】このようなフラグメントペプチド類の好ましい具体例としては、例えば、以下の式（a）あるいは（b）で示されるアミノ酸配列を含むペプチドを挙げることができる。

【0017】

（a） IPVKQADSGSSEEEKQ

（b） KSKKFRRPDIQYPDATDE

【0018】このフラグメントペプチド類は、生体高分子化合物と結合させた後、これを抗原とすることにより、効率よくオステオポンチンあるいはそのアイソマーに対する抗体を作成することができる。

【0019】フラグメントペプチド類に結合させる生体高分子化合物の例としては、スカシ貝のヘモシアニン（以下「KLH」という）、卵白アルブミン（以下、「OVA」という）、ウシ血清アルブミン（以下「BSA」という）、ウサギ血清アルブミン（以下「RSA」という）、サイログロブリン等が挙げられ、このうちKLHおよびサイログリブリンがより好ましい。

【0020】上記フラグメントペプチド類と生体高分子化合物との結合は、例えば、混合酸無水物法（B. F. E. r. langer et al. : J. Biol. Chem. 234 1090-1094 (1954)）または活性化エステル法（A. E. KARU et al. : J. Agric. Food Chem. 42 301-309 (1994)）等の公知の方法によって行うことができる。

【0021】混合酸無水物法において用いられる混合酸無水物は、フラグメントペプチド類を通常のショットテンーバウマン反応に付すことにより得られ、これを生体高分子化合物と反応させることにより目的とするペプチド-高分子化合物結合体が作成される。この混合酸無水物法において使用されるハロ蟻酸エステルとしては、例えばクロロ蟻酸メチル、ブロモ蟻酸メチル、クロロ蟻酸エチル、ブロモ蟻酸エチル、クロロ蟻酸イソブチル等が挙げられる。当該方法におけるペプチドとハロ蟻酸エステルと高分子化合物の使用割合は、広い範囲から適宜選択され得る。

【0022】なお、ショットテンーバウマン反応は塩基性化合物の存在下に行われるが、当該反応に用いられる塩基性化合物としては、ショットテンーバウマン反応に慣用の化合物、例えば、トリエチルアミン、トリメチルアミン、ピリジン、ジメチルアニリン、N-メチルモルホリン、ジアザビシクロノネン（DBN）、ジアザビシクロウンデセン（DBU）、ジアザビシクロオクタン（DABCO）等の有機塩基、炭酸カリウム、炭酸ナトリウム、炭酸水素カリウム、炭酸水素ナトリウム等の無機塩基等を使用することができる。

【0023】また上記反応は、通常、-20℃から100℃、好ましくは0℃から50℃において行われ、反応時間は5分から10時間程度、好ましくは5分から2時間である。

【0024】得られた混合酸無水物と生体高分子化合物との反応は、通常マイナス20℃から150℃、好ましくは0℃から100℃において行われ、反応時間は5分から10時間程度、好ましくは5分から5時間である。混合酸無水物法は一般に溶媒中で行われるが、溶媒としては、混合酸無水物法に慣用されているいずれの溶媒も

使用可能であり、具体的にはジクロロメタン、クロロホルム、ジクロロエタン等のハロゲン化炭化水素、ベンゼン、トルエン、キシレン等の芳香族炭化水素類、ジエチルエーテル、ジオキサン、テトラヒドロフラン、ジメトキシエタン等のエーテル類、酢酸メチル、酢酸エチル等のエステル類、N、N-ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド、ヘキサメチルリン酸トリアミド等の非プロトン性極性溶媒等が挙げられる。

【0025】一方、活性化エステル法は、一般に以下のように行うことができる。まず、フラグメントペプチドを有機溶媒に溶解し、カップリング剤の存在下にてN-ヒドロキシコハク酸イミドと反応させ、N-ヒドロキシコハク酸イミド活性化エステルを生成する。

【0026】カップリング剤としては、縮合反応に慣用されている通常のカップリング剤を使用でき、例えば、ジシクロヘキシルカルボジイミド、カルボニルジイミダゾール、水溶性カルボジイミド等が挙げられる。また、有機溶媒としては、例えばN、N-ジメチルホルムアミド(DMF)、ジメチルスルホキシド、ジオキサン等が使用できる。反応に使用するペプチドとN-ヒドロキシコハク酸イミド等のカップリング剤のモル比は好ましくは1:10~10:1、最も好ましくは1:1である。反応温度は、0~50℃、好ましくは22~27℃で、反応時間は5分~24時間、好ましくは1~2時間である。反応温度は各々の融点以上沸点以下の温度で行うことができる。

【0027】カップリング反応後、反応液を生体高分子化合物を溶解した溶液に加え反応させると、例えば生体高分子化合物が遊離のアミノ基を有する場合、当該アミノ基とペプチドのカルボキシル基の間に酸アミド結合が生成される。反応温度は、0~60℃、好ましくは5~40℃、より好ましくは22~27℃で、反応時間は5分~24時間、好ましくは1~16時間、より好ましくは1~2時間である。

【0028】上記いずれかの方法により得られた反応物を、透析、脱塩カラム等によって精製することにより、フラグメントペプチド類と生体高分子化合物との結合物(以下、単に「結合物」ということがある)を得ることができる。

【0029】次に、上のようにして得られた結合物を抗原とし、これを用いる抗体の作成法および当該抗体を用いる免疫化学的測定法について説明する。尚、抗体の調製にあたっては、公知の方法、例えば統生化学実験講座、免疫生化学研究法(日本生化学会編)等に記載の方法を適宜利用することができる。

【0030】上記結合物を使用して、本発明の結核診断剤に用いられる抗体を作成するには、当該結合物で動物を免疫し、当該動物から抗体を採取すれば良い。

【0031】すなわち、まず、例えば、フラグメントペプチド類-サイログロブリン結合物等の結合物をリン酸

ナトリウム緩衝液(以下、「PBS」という)に溶解し、これとフロイント完全アジュバントまたは不完全アジュバント、あるいはミョウバン等の補助剤と混合したものを、免疫原として哺乳動物を免疫する。

【0032】免疫される動物としては当該分野で常用されたものをいづれも使用できるが、例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヤギ、ウマ等を挙げることができる。また、免疫の際の免疫原の投与方法は、皮下注射、腹腔内注射、静脈内注射、皮内注射、筋肉内注射のいずれでもよいが、皮下注射または腹腔内注射が好ましい。免疫は1回または適当な間隔で、好ましくは1週間ないし5週間の間隔で複数回行うことができる。

【0033】次いで、常法に従い、免疫した動物から血液を採取し、そこから分離した血清を用い、オステオポンチンと反応するポリクローナル抗体を得ることができる。

【0034】また、常法に従い、前記結合物で動物を免疫して得た免疫細胞と、ミエローマ細胞とを融合させてハイブリドーマを得、当該ハイブリドーマの培養物から抗体を採取することによってオステオポンチンに対するモノクローナル抗体を得ることもできる(以下、オステオポンチン類に対するポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体を総称し、「オステオポンチン抗体」という)。

【0035】かくして得られたオステオポンチン抗体は、必要により標識ないし固相化することができる。このうち標識は、西洋わさびペルオキシダーゼ(以下「HRP」と言う)、アルカリフォスファターゼ等の酵素、フルオレセインイソシアネート、ローダミン等の蛍光物質、³²P、¹²⁵I等の放射性物質、化学発光物質などを標識物質と、オステオポンチンを結合することにより行われる。また、固相化は、適切な固相にオステオポンチン抗体を結合させることにより行われる。固相としては、免疫化学的測定法において慣用される固相のいずれをも使用することができ、例えば、ポリスチレン製の96穴マイクロタイタープレート、アミノ基結合型のマイクロタイタープレート等のプレートや、各種のビーズ類が挙げられる。オステオポンチン抗体を固相化させるには、例えば、抗体を含む緩衝液を担体上加え、インキュベーションすればよい。

【0036】本発明の結核診断剤は、上記したオステオポンチン抗体により、検体、例えば血漿、血清等から生体内でのオステオポンチンの産生の増大を検出し、これから結核罹患や、その重篤度を判断するものである。

【0037】具体的には、血漿中のオステオポンチン値が500ng/ml以上であれば、結核患者の疑いがあると診断でき、更に結核と診断された患者においては500ng/ml以上の上昇程度により重篤な結核患者であると診断することができる。

【0038】上記オステオポンチン抗体によるオステオ

ボンチンを測定する方法としては、例えば、放射性同位元素免疫測定法（RIA法）、ELISA法（Engvall, E, Methods in Enzymol, 70, 419-439(1980)）、蛍光抗体法、プラーク法、スポット法、凝集法、オクタロニー（Ouchterlony）等の、一般の免疫化学的測定法において使用されている種々の方法（「ハイブリドーマ法とモノクローナル抗体」、株式会社R&Dプランニング発行、第30頁～第53頁、昭和57年3月5日）を利用することができ、これらの方法に適した形で結核診断剤とすることができる。

【0039】そして、これらの方法は種々の観点から適宜選択することができるが、オステオボンチンの特定のエピトープを認識するオステオボンチン抗体（第一の抗体）と、この抗体の認識するオステオボンチンのエピトープとは別のエピトープを認識するオステオボンチン抗体（第二の抗体）を利用するものが好ましく、感度、簡便性等の点からはELISA法が好ましい。

【0040】より具体的には、例えば、前でも説明した、次の式（a）および（b）で表されるペプチドを含むオステオボンチンのフラグメント部分に対する抗体を使用することにより、感度良くオステオボンチンを測定することができ、この結果、結核の診断も的確に行うことができる。

(a) IPVKQADSGSSEEKQ

(b) KSKKFRRPDIQYPDATDE

【0041】また、本発明の結核診断剤の使用態様の一例としては、血漿等に存在するオステオボンチン量を測定し、その量から結核を診断することのできる結核診断用キットを挙げることができる。

【0042】この結核診断用キットの一例としては、固相化された第一の抗体を含む第一の試薬と、標識された第二の抗体を含む第二の試薬が組み合わされたものを挙げることができる。この結核診断用キットでは、オステオボンチンの検出を正確に行えるように、オステオボンチンの異なる認識部位を有する第一の抗体と第二の抗体が使用される。例えば下記式（a）のペプチドを含むオステオボンチンまたはそのフラグメントペプチド部分に対する抗体を第一の抗体とした場合は、式（b）のペプチドを含むオステオボンチンまたはそのフラグメントペプチド部分に対する抗体の何れかを第二の抗体とし、サンドイッチ法を用いた結核診断用キットを調製することができる。

(a) IPVKQADSGSSEEKQ

(b) KSKKFRRPDIQYPDATDE

【0043】このようなキットを用いることにより、血漿中のオステオボンチン量を簡便に測定することができる。

【0044】

【作用】従来の結核の診断には結核菌の検出が必要であったが、本発明の結核診断剤およびこれを利用した結核

診断用キットは、結核菌に由来しない新たな結核マーカーであるオステオボンチン量を測定するものである。

【0045】従って、本発明の結核診断剤および結核診断用キットならびにこれを利用した結核診断方法は、血液検査等における結核患者のスクリーニングに適用することができる。

【0046】

【実施例】以下、実施例を上げ本発明を更に具体的に説明するが、本発明の技術的範囲はこれらにより何ら制約されるものではない。また当業者は、本明細書の記載に基づいて容易に本発明に修飾、変更を加えることができるが、それらも本発明の技術的範囲に含まれる。

【0047】実施例 1

オステオボンチンのフラグメントペプチド部分の入手：オステオボンチンのフラグメントペプチド部分のペプチドは、HPLCクロマトグラフィー精製した状態の品をオースペップ（Auspep）社（Parkville, Australia）より購入した。それらのアミノ酸配列は、下記の（a）および（b）に示す通りである。

【0048】

(a) IPVKQADSGSSEEKQ

(b) KSKKFRRPDIQYPDATDE

【0049】実施例 2

免疫用抗原の作成：免疫原として、オステオボンチンのフラグメントペプチド部分のペプチドとサイログロブリンとの結合体をEMCS（N-（6-Maleimidocaproyloxy）-succinimide）法により、以下のようにして作成した。なお、結合体を作るにあたり、サイログロブリンとオステオボンチンのフラグメントペプチド部分のペプチドとEMCSのモル比をそれぞれ1：300：400とした。

【0050】実施例1の各オステオボンチンのフラグメントペプチド部分のペプチド4mgを、それぞれ約1mlの蒸留水に溶解した。一方、1mlの0.01Mリン酸バッファー（pH7.0）に5mgのサイログロブリンを溶解したものと、ジメチルホルムアミドで溶解したEMCS80μg/μlとをそれぞれ上述モル相当量になるように混合し、サイログロブリン-EMCS複合体溶液を作成した。この複合体溶液を3つに分け、その各々に上記オステオボンチンのフラグメントペプチド部分のペプチド溶液を上述モル相当量加えることにより、EMCSで架橋されたオステオボンチンのフラグメントペプチド部分のペプチドとサイログロブリンとの結合体溶液を作成した。

【0051】この結合体溶液を、PBSを用いて透析し、結合体として10μg/μlになるように濃度調整した。このようにして得られたオステオボンチンのフラグメントペプチド部分のペプチドとサイログロブリンとの結合体を免疫用抗原として以下の実施例に用いた。

【0052】実施例 3

オステオポンチンのフラグメントペプチド部分のペプチド (a) に対する抗体の作成：免疫用抗原として、実施例2において得られたオステオポンチンのフラグメントペプチド部分のペプチド (a) とサイログロブリンとの結合体を用い、ウサギに免疫を行った。免疫は、1週間、または2週間おきに結合体溶液 $100\mu\text{l}$ ($100\mu\text{g}$) を投与することにより行った。抗原は初回免疫のみにフロイント完全アジュバントと混和し、二回目からはフロイント不完全アジュバントと混和した。8回免疫後、採血を行い、血清を分離しこれを抗血清とした。この抗血清は、別途作成したペプチド (a) をチオールセルロファインゲル (生化学工業 (株) 製) 等に結合した抗原カラムを用いて、カラムに結合した分画のみを回収し、これを抗体とした (以下、これを「ペプチド (a) に対する抗体」という)。

【0053】実施例 4

ペプチド (a) に対する抗体のオステオポンチンに対する反応性：ペプチド (a) に対する抗体の抗原ペプチドに対する反応性は、ペプチド (a) を96穴プレートに濃度 $1.0\mu\text{g}/\text{ml}$ で4℃、一晩放置し、ブロッキング液 (0.1%BSA/PBS/0.05% NaN_3) を加えたプレートとペプチド (a) を加えないでブロッキング液のみを加えたプレートで比較することにより検討した。その結果、抗原ペプチドに対して、反応性を認めることができた。次にオステオポンチン cDNA を p cDNA 3.1ベクター (インビトロジェン社) に挿入し、CHO-K1細胞に遺伝子導入した培養上清から精製したオステオポンチンタンパク質 (以下、これを「CHO/OPN-a」という) を用いてペプチド (a) に対する抗体がOPNと反応を示すかウエスタンブロット法にて調べた。その結果、ペプチド (a) に対する抗体はオステオポンチンと反応性を示すことがわかった。

【0054】実施例 5

オステオポンチンのフラグメントペプチド部分のペプチド (b) に対する抗体の作成および抗体のオステオポンチンに対する反応性：免疫用抗原として、実施例2において得られたオステオポンチンのフラグメントペプチド部分のペプチド (b) とサイログロブリンとの結合体を用いマウスに免疫を行った。免疫したマウスの脾細胞とマウスミエローマ細胞 (X63-Ag8-653) とをポリエチレングリコール介在細胞融合技術 (Kinebuchi M. et al., J. Immunol. 146:3721-3728(1991).) を用いてハイブリドーマを作成した。これらのハイブリドーマのうちハイブリドーマが産生する抗体とオステオポンチンのフラグメントペプチド部分とが反応するものを選択した。その結果、クローン名10A16のモノクローナル抗体 (以下、これを「ペプチド (b) に対する抗体」という) を得た。次に、実施例4で得られたCHO/OPN-aを用いて、ペプチド (b) に対する抗体がオス

テオポンチンと反応性を示すかをウエスタンブロット法にて調べた。その結果、ペプチド (b) に対する抗体はオステオポンチンと反応性を示すことがわかった。

【0055】実施例 6

ペプチド (b) に対する抗体とHRPとの結合体作成：実施例5で得られたペプチド (b) に対する抗体とHRPとの結合体作成は以下のように作成した。ペプチド (b) に対する抗体の20mgをペプシン消化し、ゲル濾過することによりペプチド (b) に対する抗体のF(ab')₂フラグメントを精製し、2-メルカプトエタノールを用いることによりF(ab')₂フラグメントをFab'フラグメントに還元した。HRPとEMCSとを、37℃で60分反応させ、ゲル濾過することによりHRP-EMCS結合体を作成し、さらにこれとペプチド (b) に対する抗体のFab'フラグメントとを4℃で一晩反応させ、ゲル濾過することによりEMCS架橋によるペプチド (b) に対する抗体とHRPとの結合体を作成した。

【0056】実施例 7

サンドイッチELISA系の構築：サンドイッチELISA法の構築は以下のように作成した。 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ のペプチド (a) に対する抗体を $100\mu\text{l}$ ずつ96well ELISA用プレートに加えた。4℃一晩反応させた後、10%BSA/PBS/ NaN_3 溶液にてブロッキングを行い、これをサンドイッチELISA用プレートとした。実施例6で作成したペプチド (b) に対する抗体とHRPとの結合体を標識抗体とした。

【0057】実施例 8

サンドイッチELISA系による血漿中のオステオポンチン量の測定 (1)：実施例7で作成したサンドイッチELISA用プレートに、採取した血漿を $100\mu\text{l}$ 加え、37℃で1時間反応させた。反応後、0.05%Tween 20-PBSで4回洗浄後、標識抗体を $100\mu\text{l}$ 加え、4℃で30分間反応させた。反応後、0.05%のTween 20-PBSで6回洗浄し、TMB (Tetramethyl benzidine) 溶液を $100\mu\text{l}$ 加え、室温遮光下で30分放置した。1N硫酸で反応を止め、吸光度450nmで測定した。測定結果を図1に示す

【0058】血漿中のオステオポンチン濃度は健常人 ($186\text{ng}/\text{ml} \sim 605\text{ng}/\text{ml}$) よりも肺結核患者 ($204\text{ng}/\text{ml} \sim 2095\text{ng}/\text{ml}$) の方が有意に高かった。この図1より、オステオポンチンの量が $500\text{ng}/\text{ml}$ 以上であれば、71.4%の感度、92.3%の特異度で結核患者の疑いがあると診断できることがわかった。

【0059】実施例 9

サンドイッチELISA系による血漿中のオステオポンチン量の測定 (2)：肺結核患者の内喀痰塗沫陽性の患者と喀痰塗沫陰性の患者の血漿中のオステオポンチンを上記実施例7と同様に測定した。測定結果を図2に示

す。

【0060】血漿中のオステオポンチン濃度は、肺結核患者の内でも喀痰塗抹陰性（204 ng/ml～668 ng/ml）の患者よりも塗抹陽性患者（266 ng/ml～2095 ng/ml）の方が有意に高いものであった。

【0061】実施例 10

サンドイッチELISA系による血漿中のオステオポンチン量の測定（3）：健常人および胸部レントゲン写真により肺結核が軽症、中等症あるいは重症と診断された患者の血漿中のオステオポンチンを上記実施例7と同様に測定した。測定結果を図3に示す。

【0062】血漿中のオステオポンチンの濃度は、健常人（186 ng/ml～605 ng/ml）、軽症結核患者（204 ng/ml～668 ng/ml）、中等症結核患者（445 ng/ml～1975 ng/ml）、重症結核患者（650 ng/ml～2095 ng/ml）

1）の患者の順であり、結核患者の重症度とオステオポンチン値が一致するものであった。

【0063】

【発明の効果】本発明の結核診断薬および診断キットは、従来知られていなかった新規な結核マーカーであるオステオポンチンを、このものに対する抗体により測定するものである。そして、本発明によれば、例えば、血清、血漿等の検体に上記診断薬等を作用させるだけで、結核罹患や、その重篤度を診断することができる。

【0064】従って、本発明の結核診断薬および診断キットは、従来の結核菌を測定する結核診断法に比べ、短時間で簡単にしかも相対的に安価に結核の診断が行えるものであり、新たな結核診断剤および結核診断用キットとして広く利用することができるものである。

【0065】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<;110>; Immuno-Biological Laboratories Co., Ltd.

<;120>; A diagnosis reagent for tuberculosis and a kit for tuberculosis diagnosis with the use of them

<;130>; 0210013

<;140>;

<;141>;

<;160>; 2

<;170>; PatentIn Ver. 2.1

<;210>; 1

<;211>; 15

<;212>; PRT

<;213>; Artificial Sequence

<;220>;

<;223>; Description of Artificial Sequence:fragment peptide (a)

<;400>; 1

Ile	Pro	Val	Lys	Gln	Ala	Asp	Ser	Gly	Ser	Ser	Glu	Glu	Lys	Gln
1				5					10					15

<;210>; 2

<;211>; 18

<;212>; PRT

<;213>; Artificial Sequence

<;220>;

<;223>; Description of Artificial Sequence:fragment peptide (b)

<;400>; 2

Lys	Ser	Lys	Lys	Phe	Arg	Arg	Pro	Asp	Ile	Gln	Tyr	Pro	Asp	Ala	Thr
1				5					10					15	
Asp	Glu														

【図面の簡単な説明】

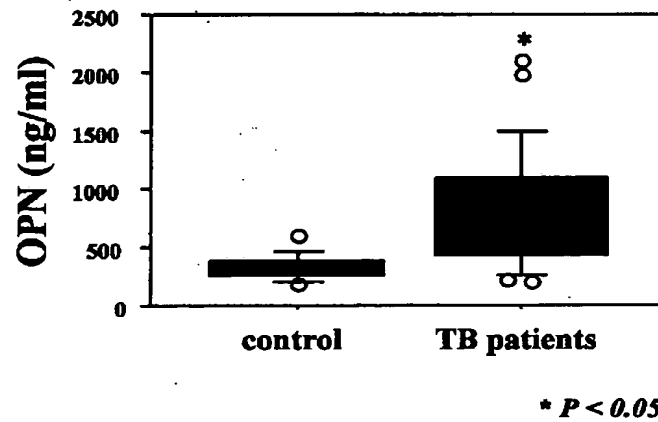
【図1】 健康人と結核患者の血漿中のオステオポンチン量を測定した結果を示す図面である。

【図2】 喀痰塗沫陰性結核患者および喀痰塗沫陽性結核患者の血漿中のオステオポンチン量を測定して結果を示す図面である。

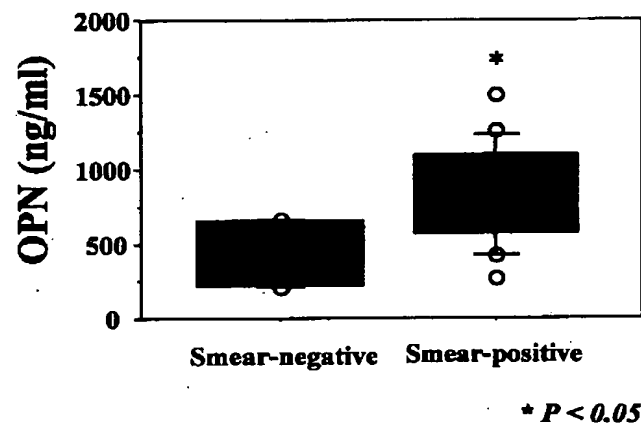
【図3】 健康人および胸部レントゲン写真により肺結核が軽症、中等症あるいは重症の患者についてオステオポンチン量を測定した結果を示す図面である。

以 上

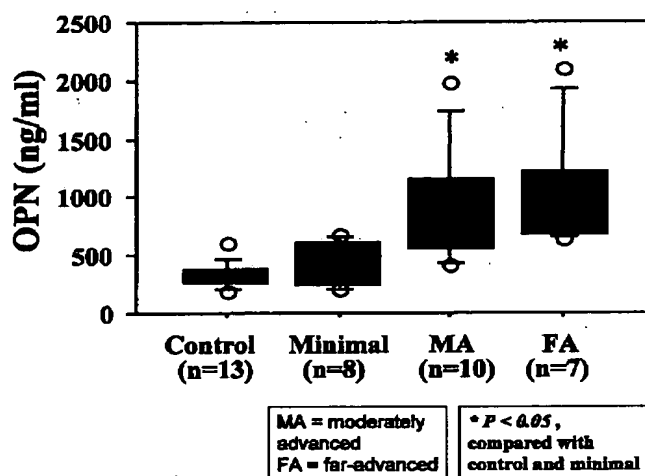
【図1】



【図2】



【図3】



フロントページの続き

(72)発明者 今 重之
群馬県藤岡市中字東田1091-1 株式会社
免疫生物研究所内

(72)発明者 前田 雅弘
群馬県藤岡市中字東田1091-1 株式会社
免疫生物研究所内

(72)発明者 成見 正作
東京都新宿区信濃町24

(72)発明者 上出 利光
北海道札幌市清田区真栄5条3丁目8-2

(72)発明者 斎藤 厚
沖縄県中頭郡北中城村字和仁屋375-3

Fターム(参考) 4H045 AA30 BA10 CA40 DA01 DA76
EA50